

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

世界知的所有権機関  
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C07H 15/04, C07F 9/09, C12P 13/02, 19/44</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/03529</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月29日(29.01.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02483</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月17日(17.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/207606 1996年7月19日(19.07.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 實酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 伊東 信(ITO, Makoto)(JP/JP) 〒819 福岡県福岡市西区愛宕浜四丁目34-1 Fukuoka, (JP) 栗田豊久(KURITA, Toyohisa)(JP/JP) 〒520-21 滋賀県大津市瀬田二丁目1番15-201号 Shiga, (JP) 光武 進(MITSUTAKE, Susumu)(JP/JP) 〒819-11 福岡県前原市大字篠原505-8 Fukuoka, (JP) 喜多克洋(KITA, Katsuhiko)(JP/JP) 〒852 長崎県長崎市丸尾町3-19 Nagasaki, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SK, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF SPHINGOLIPIDS AND SPHINGOLIPID DERIVATIVES</p> <p>(54)発明の名称 スフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質誘導体の製造方法</p> <p>(57) Abstract A process for specifically preparing sphingolipids or sphingolipid derivatives wherein the long-chain fatty acid moiety bonded to a sphingoid is modified or substituted; and sphingolipids or sphingolipid derivatives prepared by the process. The process is characterized by enzymatically reacting a sphingolipid with an aliphatic carboxylic acid or the like in the presence of an enzyme specifically hydrolyzing the acid-amide linkage between the sphingoid and the fatty acid component constituting the sphingolipid to give another sphingolipid or sphingolipid derivative different from the original one in the aliphatic acid chain.</p>		

## (57) 要約

スフィンゴ脂質等からスフィンゴイドに結合する長鎖脂肪酸の修飾あるいは置換したスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を特異的に合成する製造方法、および該製造方法により得らるスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を提供する。スフィンゴ脂質と脂肪族カルボン酸等を、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素等を用いて酵素的に反応させ、脂肪酸鎖の異なるスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とする。

## 参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MC	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

## 明 細 書

## スフィンゴ脂質及びスフィンゴ脂質誘導体の製造方法

## 技術分野

本発明は、医薬、糖質工学及び細胞工学等に有用なスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法、並びに該製造方法により得られたスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体に関する。

## 背景技術

スフィンゴ脂質はスフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン脂質、セラミド、を含む長鎖塩基スフィンゴイドを持つ脂質の総称であり、下等動物から高等動物にまで広く分布している。これらスフィンゴ脂質は近年、細胞の増殖、分化誘導、アポトーシス等のような生物活性において重要な役割に関与していることが明らかにされつつある。また、細胞表層の構成成分であることから化粧品等への添加物としても使用されつつある。

スフィンゴ脂質は、共通構造としてスフィンゴイドのアミノ基に不均一な鎖長の長鎖脂肪酸を酸アミド結合したセラミド構造を有している。スフィンゴ脂質の長鎖脂肪酸を修飾あるいは置換したスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造法は、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基に酸アミド結合した脂肪酸を欠くリゾスフィンゴ脂質を出発原料として、化学的、酵素的に合成する方法が知られている。

化学的方法としては、リゾ体のアミノ基に以下の様な方法で脂肪酸あるいは脂肪酸誘導体を縮合させる方法がある。例えば、脂肪酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル等の脂肪酸活性エステルを用いる方法、脂肪酸とカルボニルジイミダゾールやジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカップリング試薬を用いる方法、脂肪酸の無水物を用いる方法、脂肪酸塩化物を用いる方法などが知られている。

酸性糖脂質のリゾ体としてリゾガングリオシドを用いる方法は、メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第138巻、第319～341頁(1987)、欧州特許第373039号B1公報(1994)及び欧州特許公開第76

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

5883号A1公報(1997)に報告されている。また、スフィンゴリン脂質のリゾ体としてスフィンゴシルホスホリルコリン(リゾスフィンゴミエリン)を用いる方法が、ジャーナル オブ リピッド リサーチ (Journal of Lipid Research)、第28巻、第710～718頁(1987)に記載されている。

これらの方法によるとO-アシル化等の副反応が起こる場合があり選択的にN-アシル化された物を得るためには保護基の使用、精製等に煩雑な操作が必要である。また、スフィンゴホスホリリドの一種セラミドシリアチンやアミノ糖を含むスフィンゴ糖脂質を化学的に脱アシル化して得られるデ-N-アセチルリゾガングリオシドのようにスフィンゴイドのアミノ基以外にアミノ基をもつスフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基だけを選択的にアシル化したいときには保護基の導入、部分的アシル化、アシル化後の部分的脱アシル化といった操作、あるいはデ-N-アセチルリゾガングリオシドをリボソームに取り込ませた後、選択的にN-アシル化する等の煩雑な操作が必要であり困難を伴う。

一方、酵素的合成方法は、国際公開番号WO94/26919号公報に記載されている。この方法は、有機溶媒中でリパーゼにより縮合を行う方法であり、実質的に無水の有機溶媒が必要であり、基質の溶解性により基質が限定される。国際公開番号WO94/26919号公報には、セラミド及びハイブリッドセラミドの酵素的合成方法が記載されているが、反応も特異的なものではなくO-アシル化物の生成が見出されており、また化学的合成法と同様に複数のアミノ基をもつ場合、スフィンゴイドのアミノ基だけに特異的に作用させることは困難である。

上述したように、従来の化学的あるいは酵素的にスフィンゴ脂質の長鎖脂肪酸を修飾あるいは置換しスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を合成する方法は、望ましくない副生成物ができたり、基質が限定されたりするものである。また、従来の方法は、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドの2位に酸アミド結合する脂肪酸を欠くリゾスフィンゴ脂質を出発原料として用いる方法であり、目的のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を合成するためには、その合成をする前に、まずリゾスフィンゴ脂質を調製する必要があった。

したがって、本発明の目的は、リゾスフィンゴ脂質のみならずスフィンゴ脂質から

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

スフィンゴイドに結合する長鎖脂肪酸の修飾あるいは置換したスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を特異的に合成する製造方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、該製造方法により得られたスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法に関する発明であって、スフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、脂肪酸鎖の異なるスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とする。

本発明の第2の発明は、他のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法に関する発明であって、リソスフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とする。

本発明の第3の発明は、更に他のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法に関する発明であって、少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、脂肪酸鎖の交換されたスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とする。

本発明の第4の発明は、同じくスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法に関する発明であって、前記した本発明の第1～第3の発明における酵素の代りに、該酵素の生産能を有する微生物を用いて、それと反応原料とを接触させて目的物を得ることを特徴とする。

本発明の第5の発明は、スフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体に関する発明であって、前記本発明の第1～第4の発明のいずれかの製造方法により得られたものであることを特徴とする。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

本発明者らは、任意のスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体の合成法について検討を行った結果、リゾスフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミノ基への脂肪酸の再結合、あるいはスフィンゴ脂質のスフィンゴイドに酸アミド結合する脂肪酸と別の脂肪酸との置換が、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドの酸アミド結合に作用しリゾスフィンゴ脂質と脂肪酸に加水分解する酵素によって、任意のスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を合成できることを見出し、本発明に到達した。

従来、酵素による逆反応あるいは転移反応は、同時に起こる加水分解反応を抑える必要から受容体に対して供与体を大過剰に添加したり、有機溶媒系で反応を行わなければならなかった。しかしながら、本発明者らは、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いることにより、水溶液中の緩和な条件において、受容体に対して供与体を大過剰添加することなくスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を合成できることを見出し、本発明を完成した。

#### 図面の簡単な説明

図1は、SCDaseによる逆反応の脂肪酸分子種に対する特異性を示す図である。

図2は、SCDaseによる逆反応の至適pHを示す図である。

図3は、SCDaseの加水分解反応、逆反応、脂肪酸交換反応の反応率を示す図である。

図4は、B16細胞におけるセラミダーゼの活性測定を比較する図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本明細書において、スフィンゴ脂質とは、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン脂質、セラミド、を含む長鎖塩基スフィンゴイドを有する天然物あるいは合成物を単体、あるいはそれらの混合物等が挙げられる。また、本明細書において、リゾスフィンゴ脂質とは、スフィンゴイドのアミノ基に酸アミド結合した脂肪酸を欠くスフィンゴ脂質のN-脱アシル体を示す。

本明細書において、脂肪族カルボン酸には、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸はもちろんのこと、それら脂肪酸の炭化水素鎖が、ハロゲン、置換若しくは非置換のアミノ基、



WO 98/03529

PCT/JP97/02483

オキソ基、水酸基等の官能性基で置換されている酸、あるいは当該炭化水素鎖中に酸素、硫黄、アミノ基を有する酸等の脂肪族性をもつカルボン酸がすべて含まれる。

更に、本明細書において、スフィンゴリピドセラミドデアシラーゼとは、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドのアミド結合に作用しリソスフィンゴ脂質と脂肪酸とに特異的に加水分解する酵素を意味する。すなわち、特異的にはスフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合のみを加水分解することを意味する。

その例としては、スフィンゴ糖脂質（ガングリオシド、中性糖脂質）、スフィンゴリン脂質（スフィンゴミエリン）を含むスフィンゴ脂質に幅広く作用する酵素としてシュードモナス属に属する微生物の生産するスフィンゴリピドセラミドデアシラーゼ [S C D a s e、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第 2 7 0 巻、第 2 4 3 7 0 ~ 2 4 3 7 4 頁 (1 9 9 5)、欧州特許公開第 7 0 7 0 6 3 号 A 1 公報 (1 9 9 6)]、ガングリオシドのみに作用する酵素としてノカルディア (Nocardia) 属に属する微生物の生産するガングリオシド セラミダーゼ [ジャーナル オブ バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、第 1 0 3 巻、第 1 ~ 4 頁 (1 9 8 8)、USP 4 9 9 7 7 6 0 公報、USP 5 1 4 3 8 4 1 公報]、ロドコッカス (Rhodococcus) 属に属する微生物の生産する中性糖脂質のみに作用しリソ体を生ずる酵素 (特開平 6 - 7 8 7 8 2 号公報)、スフィンゴ糖脂質に作用する酵素としてストレプトミセス (Streptomyces) 属に属する微生物の生産するグリコスフィンゴリピドセラミドデアシラーゼ [バイオサイエンス、バイオテクノロジー、アンド バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry)、第 5 9 巻、第 2 0 2 8 ~ 2 0 3 2 頁 (1 9 9 5)、特開平 7 - 1 0 7 9 8 8 号公報]、あるいはセラミドに作用するセラミダーゼ (アシルスフィンゴシンデアシラーゼ、EC 3. 5. 1. 23、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第 2 4 1 巻、第 3 7 3 1 ~ 3 7 3 7 頁 (1 9 6 6)、バイオケミストリー (Biochemistry)、第 8 巻、第 1 6 9 2 ~ 1 6 9 8 頁 (1 9 6 9)、バイオキミカ エ バイオフィジカ アクタ (Biochimica Biophysica Acta)、第 1 7 6 巻、第 3 3 9 ~ 3 4 7 頁 (1 9 6 9)、サイエンス (Science)、第 1 7 8 巻、第 1 1 0 0 ~ 1 1 0 2 頁 (1 9 7 2)] 等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

また、これら酵素をコードする遺伝子を用いて得られた組換え体の酵素、更に、これ

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

ら酵素をコードする遺伝子が欠失、付加、挿入若しくは置換された遺伝子を用いて得られる組換体の酵素であっても、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素であれば、本明細書で言うスフィンゴリピドセラミドデアシラーゼに含まれる。

また、該酵素の使用に際しては、該酵素の精製品、該酵素を含む培養液又は粗抽出液を用いることができる。

更に、既述のように、前記した酵素の代りに、該酵素の生産能を有する微生物を用いてもよい。

本明細書において、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素の生産能を有する微生物とは、上記のスフィンゴリピドセラミドデアシラーゼを生産することができる微生物であれば、特に限定されるものではなく、細菌類、酵母類、放線菌類、糸状菌類、子囊菌類、担子菌類等の微生物、更には、植物、昆虫、動物等の生体由来の細胞も含まれる。

また、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドの酸アミド結合に作用しリソスフィンゴ脂質と脂肪酸とに加水分解する酵素、あるいはその酵素の生産能を有する菌体は、従来周知であるような固体担体上に固定されても良いし、リボソームや逆ミセルに取り込まれても良い。高分子物質により修飾された酵素を用いることもできる。

本発明の反応は通常、原料となるスフィンゴ脂質又はリソスフィンゴ脂質、標識を有し、又は有しない脂肪酸カルボン酸、精製酵素、粗抽出液、培養液、微生物のいずれかを含む緩衝液中で進行する。また、微生物の場合、その微生物の培養液中に、原料となるスフィンゴ脂質又はリソスフィンゴ脂質、当該脂肪酸カルボン酸を加えてもよい。また、これら原料の使用量は特に限定されず、その飽和量まで使用できる。通常、当該脂肪酸カルボン酸が過剰に存在する状態が望ましいが、本発明においてはスフィンゴ脂質又はリソスフィンゴ脂質と、脂肪酸カルボン酸とのモル比は1:1でも進行し、スフィンゴ脂質又はリソスフィンゴ脂質が過剰に存在しても良い。

更に、酵素あるいは酵素を生産する微生物の使用量は特に限定されるものではなく、広い範囲から適宜選択でき、例えば出発溶液1ml当り、通常0.1mU以上、より

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

好ましくは3 mU～10 U程度使用すればよい。緩衝液としては、pHが5～9程度の好適な緩衝液を用いれば良く、通常pH6～7付近の緩衝液中で行うことが望ましい。また、緩衝液中には通常、酵素の活性化あるいは基質の溶解のために界面活性剤を添加するのが好ましい。界面活性剤として胆汁酸系界面活性剤あるいは非イオン性界面活性剤等が使用できる。界面活性剤の添加量は、その酵素の活性化、基質の溶解のため、あるいは生成物が効率よく得られる量で使用すればよく、特に限定されるものではないが、好適には0.01%～2%の範囲内で添加することが好ましい。また更に、これらの反応液に有機溶媒を添加しても良く、この時の有機溶媒は水溶性有機溶媒でも良く、また不溶性有機溶媒との2相系で反応を行っても良い。有機溶媒添加量は酵素が失活せず生成物が効率よく得られる量であれば良く、特に限定されるものではない。

このようにして生成したスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体は、薄層クロマトグラフィーによって確認できる。

本発明によって得られたスフィンゴ脂質は有機化合物の一般的に用いられるクロマトグラフィーによって単離精製できる。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に示すが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

ガラクトシルスフィンゴシン（シグマ社製）5 nmol、 $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸（アマシャム社製）5 nmol、0.8%トリトン（Triton）X-100、シュードモナス属由来SCDase [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、第270巻、第24370～24374頁（1995）、欧州特許公開第707063号A1公報（1996）] 150  $\mu\text{U}$ を含む50 mMの酢酸緩衝液（pH6.0）50  $\mu\text{l}$ を37℃で一晩反応させた。

反応液を薄層クロマトグラフィーにより展開（展開溶媒 クロロホルム：メタノール：0.25%塩化マグネシウム水溶液＝65：25：4）し、イメージングプレー

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

トに露光しBAS1000イメージングアナライザー（富士フィルム社製）でクロマトグラムを得た。この時 $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸と新たに生成したガラクトシルセラミドのバンドだけが検出された。

薄層プレートからガラクトシルセラミドに対応する部分をかき取りクロロホルム：メタノール＝2：1（v/v）で抽出した。抽出液を乾固した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ〔ジャック ビーン（Jack bean）由来〕16 mU、0.4%タウロデオキシコール酸を含む50 mM酢酸緩衝液（pH 6.0）10  $\mu$ lに溶解し37℃で一晩、酵素消化を行った。反応液を再び薄層クロマトグラフィーにより展開（展開溶媒 クロロホルム：メタノール：アンモニア水＝90：10：1）し、BAS1000イメージングアナライザー（富士フィルム社製）で解析した結果、セラミドと同じR<sub>f</sub>値を与えるバンドが検出された。また非標識ステアリン酸を用い前述と同様の反応、薄層クロマトグラフィー、抽出操作によって得られた生成物をファースト アトム ボンバードメントマスマスペクトル（FAB-MS）分析した結果、ガラクトシルセラミドの親イオンピークに一致する $m/z = 462$ のピーク及びセラミドの分子イオンピークに一致するフラグメントイオンピーク $m/z = 548$ が検出された。以上の結果により、逆反応によりスフィンゴシン部分のアミノ基に脂肪酸が転移されていることが明らかとなった。

## 実施例 2

スフィンゴシルホスホリルコリン（リゾスフィンゴミエリン、シグマ社製）50 nmol、 $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸5 nmol、0.8%トリトンX-100、シュールドモナス属由来SCDase 150  $\mu$ Uを含む50 mM酢酸緩衝液（pH 6.0）50  $\mu$ lを37℃で一晩反応させた。

反応液を薄層クロマトグラフィーにより展開（展開溶媒 クロロホルム：メタノール：0.02%塩化カルシウム水溶液＝5：4：1）し、BAS1000イメージングアナライザー（富士フィルム社製）で解析した。この時 $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸と新たに生成したスフィンゴミエリンのバンドだけが検出された。

薄層プレートからスフィンゴミエリンに対応する部分をかき取り抽出した後、乾固し逆反応生成物を得た。生成物をスタフィロコッカス アウレウス（Staphylococcus

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

aureus)由来スフィンゴミエリナーゼ(シグマ社製) 35.7  $\mu$ Uを含む25 mMリン酸緩衝液(pH 7.5) 20  $\mu$ lに溶解し、37℃で一晩、酵素消化を行った。

反応液を再び薄層クロマトグラフィにより展開(展開溶媒 クロロホルム/メタノール/アンモニア水=90:10:1)し、BAS1000イメージングアナライザーで解析した結果、セラミドと同じRf値を与えるバンドが検出された。このことから逆反応によりスフィンゴシン部分のアミノ基に脂肪酸が転移されていることが明らかとなった。

### 実施例3 SCDaseによる各種アクセプターに対する逆反応1

[1-<sup>14</sup>C]ステアリン酸1 nmol、リゾスフィンゴ脂質1 nmol、0.8%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase 30  $\mu$ Uを含む50 mM酢酸緩衝液(pH 6.0) 10  $\mu$ lを37℃で一晩反応した。得られた反応液を薄層クロマトグラフィで展開し、イメージングプレートに露光しBAS1000イメージングアナライザー(富士フィルム社製)で反応生成物の定量を行った。その結果を表1に示す。

表1に示したように各種リゾスフィンゴ糖脂質に幅広く作用するのみならずリゾスフィンゴリン脂質、スフィンゴシンをも受容体とし作用することができる。

表 1

リゾスフィンゴ脂質	相対活性(%)
ガラクトシルスフィンゴシン	100.0
リゾスルファチド	59.6
リゾラクトシルセラミド	37.2
リゾグロボシド	34.1
リゾガングリオシドGM1a	15.4
リゾスフィンゴミエリン	5.7
スフィンゴシン	11.5

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

## 実施例4 SCDaseによる各種アクセプターに対する逆反応2

N-トリフルオロアセチル化アミノドデカン酸66.6nmol、リゾスフィンゴ脂質33.3nmol、0.3%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase148μUを含む25mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH11)41.6μlを37℃、48時間反応させた。

得られた反応液を薄層クロマトグラフィーで展開し、スフィンゴ糖脂質はオルシノール硫酸により発色させ、その他のスフィンゴ脂質はクマシーブリリアントブルーにより発色させた後、イメージングデンストメーター(バイオラッド社製)で反応生成物の定量を行った。その結果を表2に示す。

実施例3と同様に、表2に示したように各種リゾスフィンゴ脂質に幅広く作用するのみならず、スフィンゴシンをも受容体として作用することができる。

表 2

リゾスフィンゴ脂質	反応効率 (%)
スフィンゴシン	69
リゾガングリオシドGM3	24
リゾガングリオシドGD3	13
リゾガングリオシドGM1a	29
リゾガングリオシドGD1a	32

## 実施例5 SCDaseの逆反応の脂肪酸分子種に対する特異性

ガラクトシルスフィンゴシン(シグマ社製)5nmol、各種非標識脂肪酸5nmol、0.8%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase150μUを含む50mM酢酸緩衝液(pH6.0)50μlを37℃で一晩反応させた。

得られた反応液を薄層クロマトグラフィーで展開後、オルシノール硫酸により発色しクロマトスキャナーCS9000(島津製作所社製)で定量した。その結果を図1

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

に示す。すなわち、図1はSCDaseの逆反応の脂肪酸分子種に対する特異性を示す図であり、縦軸に脂肪酸、横軸に収率(%)を示す。

#### 実施例6 SCDaseによる逆反応の至適pH

ガラクトシルスフィンゴシン1nmol、[1-<sup>14</sup>C]ステアリン酸1nmol、0.8%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase 30μUを含む10μlの各種緩衝液を37℃で3時間反応させた。この結果を図2に示す。すなわち、図2は逆反応の至適pHを示す図であり、縦軸に分解率(%)、横軸にpHを示す。図中、白四角印は酢酸緩衝液、黒三角印はリン酸緩衝液、黒丸印はグリシン-NaOH緩衝液を示す。

#### 実施例7 SCDaseによる各種アクセプターに対する脂肪酸交換反応

[1-<sup>14</sup>C]ステアリン酸1nmol、スフィンゴ脂質1nmol、0.8%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase 30μUを含む50mM酢酸緩衝液(pH6.0)10μlを37℃で一晩反応した。

得られた反応液を薄層クロマトグラフィーで展開後、イメージングプレートに露光し、BAS1000イメージングアナライザー(富士フィルム社製)で反応生成物の定量を行った。その結果を表3に示す。

表3に示したようにスフィンゴ脂質に対して幅広く脂肪酸交換反応を行うことが可能である。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

表 3

スフィンゴ脂質	相対活性 (%)
ガラクトシルセラミド	100.0
グルコシルセラミド	129.0
スルファチド	31.7
ラクトシルセラミド	112.0
アシアロGM1	164.0
グロボシド	141.0
ガングリオシドGM3	54.4
ガングリオシドGM2	5.5
ガングリオシドGM1a	2.4
ガングリオシドGD1a	6.2
ガングリオシドGD1b	1.2
スフィンゴミエリン	2.9
セラミド	77.5

#### 実施例 8 反応条件の検討

加水分解反応、逆反応、脂肪酸交換反応の条件を検討するために、下記反応条件 (A) 及び (B) を用い反応を行った。

反応条件 (A) : シュードモナス属由来 SCDase 120  $\mu$ U、0.8% トリトン X-100 を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 200  $\mu$ l に、基質として、加水分解反応時には 100  $\mu$ M [1- $^{14}$ C]-ガラクトシルセラミドを、逆反応時には 100  $\mu$ M [1- $^{14}$ C] ステアリン酸と 100  $\mu$ M ガラクトシルスフィンゴシンを、脂肪酸交換反応時には 100  $\mu$ M [1- $^{14}$ C] ステアリン酸と 100  $\mu$ M ガラクトシルセラミドをそれぞれ含む。

反応条件 (B) : シュードモナス属由来 SCDase 120  $\mu$ U、0.1% トリ



WO 98/03529

PCT/JP97/02483

トンX-100を含む25 mMリン酸緩衝液(pH 7.0) 200  $\mu$ lに、基質として、加水分解反応時には100  $\mu$ M  $^{14}$ C-ガラクトシルセラミドを、逆反応時には100  $\mu$ M  $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸と100  $\mu$ Mガラクトシルスフィンゴシンを、脂肪酸交換反応時には100  $\mu$ M  $[1-^{14}\text{C}]$ ステアリン酸と100  $\mu$ Mガラクトシルセラミドをそれぞれ含む。

上記反応条件において37°Cで反応し、0.25、0.5、1、3、7、21時間経過毎に各反応液からそれぞれ20  $\mu$ lずつを取り、100°C、5分間加熱し反応を止めた。

得られた反応液を薄層クロマトグラフィーで展開(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:0.02%塩化カルシウム水溶液=5:4:1)し、BAS1000イメージングアナライザー(富士フィルム社製)で反応生成物及び未反応物を定量し反応率を算出した。その結果を図3に示す。すなわち、図3は上記反応条件(A)及び(B)でのSCDaseの加水分解反応、逆反応、脂肪酸交換反応の反応率を示す図であり、縦軸に反応率(%）、横軸に反応時間(h)を示す。図中、白丸印は加水分解反応、白四角印は逆反応、白三角印は脂肪酸交換反応の反応率を示す。

この結果、SCDaseの加水分解反応は、反応液が酸性pHで、かつ、高濃度の界面活性剤存在下で優先的に進行し、また、SCDaseの逆反応及び脂肪酸交換反応は、反応液が中性域で、かつ、界面活性剤の濃度が下がると優先的に進行することが明らかとなった。

#### 実施例9 $^{14}$ Cセラミドの合成

エタノールに溶解した $[1-^{14}\text{C}]$ パルミチン酸(アマシャム社製)100 nmol (5.0  $\mu$ Ci)とスフィンゴシン200 nmolを反応容器に入れ、窒素ガスにより完全に乾固した。その容器に、0.6%トリトンX-100を含む50 mMリン酸緩衝液(pH 7.0) 0.5 mlを加え、よく攪拌した後、超音波処理により均一化した。この均一化した溶液に、シュドモナス由来SCDase (1 mU/ml) 0.5 mlを加え、37°C、20時間反応を行った。

反応終了後、得られた反応液を遠心濃縮機により乾固し、この乾固した反応物をヘキサン:エーテル:酢酸=50:50:1 (v/v) 1 mlに溶解させ、同溶液にて

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

平衡化したSep-Pak® シリカカートリッジに添加し、未反応の $[1-^{14}\text{C}]$ パルミチン酸を10 mlの同溶液で洗い流した後、クロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 10 mlで $^{14}\text{C}$ セラミドを溶出した。

溶出液は、窒素ガスにより乾固した後、蒸留水に懸濁し、更に超音波処理により均一化した。この均一化した溶液をSep-Pak® C18カートリッジに添加した。このカートリッジを蒸留水20 mlで洗浄し、メタノール3 mlとクロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 10 mlで $^{14}\text{C}$ セラミドを溶出した。

次に、得られた溶出液は窒素ガスにより乾固し、クロロホルム：メタノール：蒸留水=90：10：1 (v/v) に溶解した後、同溶液で平衡化したSep-Pak®

CMカートリッジに添加することにより、未反応のスフィンゴシンを吸着させた。この際、通過画分を窒素ガスにより乾固し、混在脂肪酸及びスフィンゴシン1%以下の精製 $^{14}\text{C}$ セラミド66 nmol (3.3  $\mu\text{Ci}$ )を得た。

#### 実施例10 アミノセラミド及びその蛍光誘導体の合成

N-トリフルオロアセチル化アミノドデカン酸66.6  $\mu\text{mol}$ 、スフィンゴシン(シグマ社製)33.3  $\mu\text{mol}$ 、0.3%トリトンX-100、シュードモナス属由来SCDase 148 mUを含む25 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 11) 41.6 mlを37°C、48時間反応させた。

反応終了後、反応液をC18逆相シリカカラムに負荷し、水でカラムを洗浄して脱塩し、クロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) でN-トリフルオロアセチル化アミノセラミドを溶出した。溶媒を留去後、クロロホルム：メタノール：水=90：10：1に溶かし、Sep-Pak® CMカートリッジ(ウォーターズ社製)に負荷して未反応のスフィンゴシンを吸着させ、N-トリフルオロアセチル化アミノセラミドを含む非吸着画分を得た。この非吸着画分をSep-Pak® QMAカートリッジ(ウォーターズ社製)に負荷して、未反応のN-トリフルオロアセチル化アミノドデカン酸を吸着させ、精製されたN-トリフルオロアセチル化アミノセラミドを含む非吸着画分を得た。

得られたN-トリフルオロアセチル化アミノセラミド、1%ナトリウムメトキシドを含むクロロホルム：メタノール=2：1 (v/v) 20 mlを室温で一晩反応させ

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

た。反応終了後、溶媒を留去し、水に懸濁してSep-Pak® C18カートリッジ（ウォーターズ社製）に負荷し、水でカラムを洗浄して脱塩し、クロロホルム：メタノール＝2：1（v/v）でアミノセラミドを溶出した。溶媒を留去後、クロロホルム：メタノール：水＝60：30：5に溶かしてSep-Pak® CMカートリッジに負荷し、クロロホルム：メタノール：1N HCl＝60：30：5で溶出した後、乾固し、精製されたアミノセラミド5.6  $\mu\text{mol}$ を得た。

メタノールに溶かした100 nmolアミノセラミド70  $\mu\text{l}$ 、50 mMフッ化NBD（シグマ社製）エタノール溶液20  $\mu\text{l}$ 、トリエチルアミン10  $\mu\text{l}$ を60℃で1時間反応させた。反応終了後、溶媒を留去し、ヘキサン：エーテル：酢酸＝50：50：1に溶かしてSep-Pak® シリカカートリッジ（ウォーターズ社製）に負荷し、クロロホルム：メタノール＝2：1（v/v）で溶出した後、乾固し、精製されたNBDセラミド30 nmolを得た。

#### 実施例11 蛍光スフィンゴ脂質誘導体NBDセラミドを用いたカプトガニセラミダーゼのスクリーニング

カプトガニ血液を遠心分離して得られた血清10  $\mu\text{l}$ と、実施例10で作製したNBDセラミド1 nmol、0.5%トリトンX-100を含む50 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）10  $\mu\text{l}$ を37℃、18時間反応させた。反応終了後、反応液を薄層クロマトグラフィーにより展開（展開溶媒 クロロホルム：メタノール：25%アンモニア水＝90：20：0.5）し、紫外線ランプで検出した。このとき新たに生成したNBDアミノドデカン酸が検出され、カプトガニの血清中にセラミダーゼ活性が検出された。

カプトガニの血清中で確認されたセラミダーゼ活性が本当にセラミダーゼ由来の活性であるかどうか確認するため、このセラミダーゼを精製したところ、ゲルろ過法により分子量約205 kDa、至適pH 4.5の酸性セラミダーゼであることが分かった。また、このカプトガニセラミダーゼは、N-ステアロイルスフィンゴシン（C18：0、d18：1）を最もよく分解し、長鎖塩基としてスフィンガニンやフィトスフィンゴシンを含むセラミドに対しても活性を有していることが分かった。

このように、これまで存在が知られていなかった無脊椎動物のセラミダーゼが、本

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

発明の製造方法で得た蛍光スフィンゴ脂質誘導体NBDセラミドを用いることにより、その存在が初めて明らかとなり、蛍光スフィンゴ脂質誘導体NBDセラミドがセラミダーゼ活性測定用の基質として有用であることが分かった。

実施例12 放射性同位体標識 $^{14}\text{C}$ セラミド( $\text{C12-}^{14}\text{C-Cer}$ )及び蛍光スフィンゴ脂質誘導体NBDセラミド( $\text{C12-NBD-Cer}$ )を基質とするB16細胞におけるセラミダーゼ活性測定

$6 \times 10^6$  個のB16細胞を10mMリン酸緩衝液200 $\mu\text{l}$ に懸濁し、細胞破砕液を調製した。タンパク量はMicroBCA<sup>TM</sup> protein assay reagent (ピアス社製)により定量した。

反応条件1:細胞破砕液10 $\mu\text{l}$ (タンパク量50 $\mu\text{g}$ に希釈)、基質として実施例10で得た $\text{C12-NBD-Cer}$ 200pmol又は実施例9で用いたパルミチン酸の代わりにラウリン酸を用いて得た $\text{C12-}^{14}\text{C-Cer}$ 100pmol、0.5%トリトンX-100を含む50mM酢酸緩衝液(pH4.0)10 $\mu\text{l}$ の酸性条件下。

反応条件2:細胞破砕液10 $\mu\text{l}$ (タンパク量50 $\mu\text{g}$ に希釈)、基質として $\text{C12-NBD-Cer}$ 200pmol又は $\text{C12-}^{14}\text{C-Cer}$ 100pmol、0.5%トリトンX-100を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)10 $\mu\text{l}$ の中性条件下。

反応条件3:細胞破砕液10 $\mu\text{l}$ (タンパク量50 $\mu\text{g}$ に希釈)、基質として $\text{C12-NBD-Cer}$ 200pmol又は $\text{C12-}^{14}\text{C-Cer}$ 100pmol、0.5%トリトンX-100を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)10 $\mu\text{l}$ の塩基性条件下。

上記反応条件で、それぞれ37℃、3又は6時間反応を行った。その後、反応液にクロロホルム:メタノール(2:1)100 $\mu\text{l}$ を加え反応を止めた。得られた反応液は乾固した後、クロロホルム:メタノール(2:1)に溶解し試料とした。

各試料は薄層クロマトグラフィーで展開(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:25%アンモニア水=90:20:0.5)し、遊離した $^{14}\text{C}$ 脂肪酸はBAS1000イメージングアナライザー(富士フイルム社製)を用い定量し、反応率を算出した。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

また、遊離したNBD脂肪酸はクロマトスキャナーCS9000（島津製作所社製）を用い、それぞれ定量し、反応率を算出した。その結果を図4に示す。すなわち、図4はB16細胞におけるセラミダーゼの活性測定を比較する図であり、縦軸の上からC12-NBD-Cerを基質とし3時間（3hr）及び6時間（6hr）反応を、C12-<sup>14</sup>C-Cerを基質とし3時間及び6時間反応を示し、横軸に分解率（%）を示す。

この結果から、B16細胞にはC12-NBD-Cerによく作用するがC12-<sup>14</sup>C-Cerにあまり作用しないアルカリ性セラミダーゼと、C12-<sup>14</sup>C-Cerによく作用するがC12-NBD-Cerにあまり作用しない酸性セラミダーゼが存在することが示唆された。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、スフィンゴ脂質の共通部分であるセラミド部分の長鎖脂肪酸の修飾、置換を行いスフィンゴ脂質誘導体の製造方法が提供される。また当該製造方法を用いて任意のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を工業的に有利に製造することが可能となる。天然スフィンゴ脂質は一般に長鎖脂肪酸鎖長に多様性があり、均一な長鎖脂肪酸鎖長のスフィンゴ脂質を得ることが困難であった。しかしながら、本発明の長鎖脂肪酸の置換によって、長鎖脂肪酸が均一化されたスフィンゴ脂質を得ることができる。また、スフィンゴ脂質の脂肪酸部分に、発色団を形成する物質、蛍光物質、ビオチン、放射性同位元素等を導入して、標識スフィンゴ脂質を作製することも可能となり、スフィンゴ脂質の細胞内代謝や輸送経路の解明等への応用が可能となる。更に、スフィンゴ脂質のセラミド部分の変換、例えばエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）等の機能性高度不飽和脂肪酸を導入することによって、細胞への浸透性、細胞での代謝、あるいは生物活性を改変した新しいスフィンゴ脂質誘導体を作出でき、医薬、化粧品、細胞工学等への応用ができる。

本発明の製造方法により、医薬、糖質工学及び細胞工学等に有用な、任意のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を効率よく安価に調製することが可能となった。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

## 請 求 の 範 囲

1. スフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、脂肪酸鎖の異なるスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

2. リソスフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

3. 少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素を用いて酵素的に反応させ、脂肪酸鎖の交換されたスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

4. スフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素の生産能を有する微生物と接触させ、脂肪酸鎖の異なるスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

5. リソスフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸とを、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素の生産能を有する微生物と接触させ、スフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

6. 少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を、スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素の生産能を有する微生物と接触させ、脂肪酸鎖の交換されたスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質誘導体を得ることを特徴とするスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体の製造方法。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

7. スフィンゴ脂質のスフィンゴイドと脂肪酸との酸アミド結合を特異的に加水分解する酵素が、スフィンゴリピドセラミドデアシラーゼである請求の範囲第1～6項のいずれか1項に記載の製造方法。

8. 酵素が、シュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌の生産する酵素である請求の範囲第7項記載の製造方法。

9. スフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸を添加した培地中で微生物を培養することを特徴とする請求の範囲第4項記載の製造方法。

10. リソスフィンゴ脂質と、標識を有し、又は有しない脂肪族カルボン酸を添加した培地中で微生物を培養することを特徴とする請求の範囲第5項記載の製造方法。

11. 少なくとも異なる2種のスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体を添加した培地中で微生物を培養することを特徴とする請求の範囲第6項記載の製造方法。

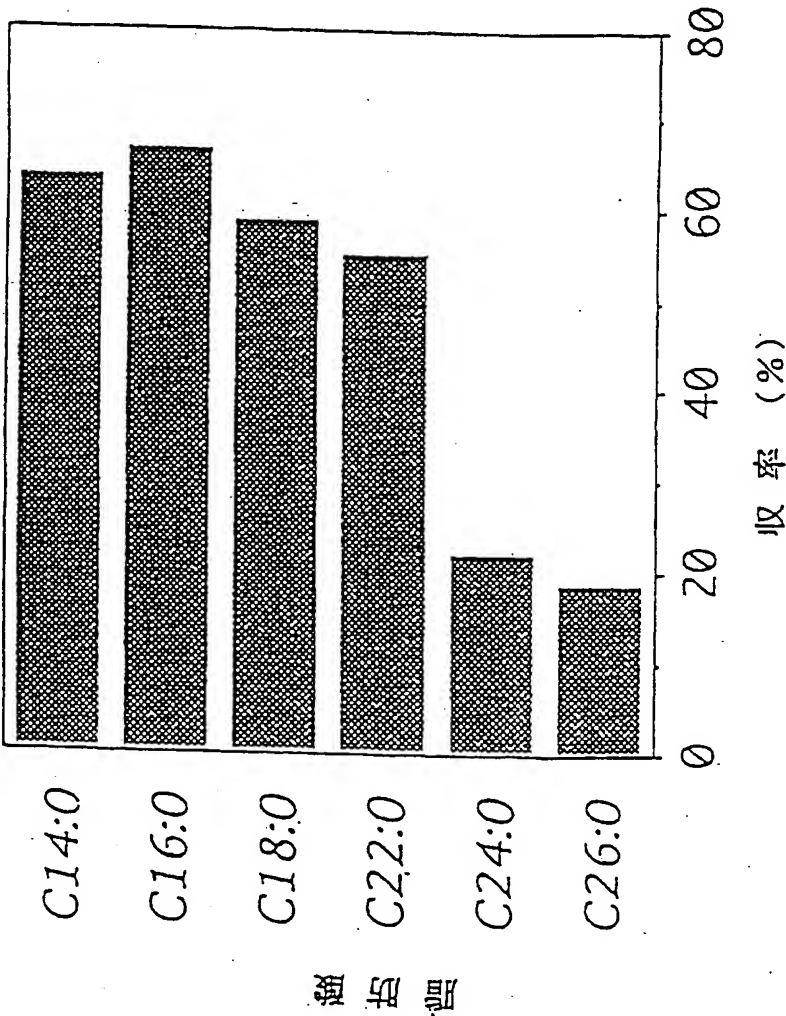
12. 微生物がシュードモナス属に属する細菌である請求の範囲第4～6項のいずれか1項に記載の製造方法。

13. 請求の範囲第1～12項のいずれか1項に記載の製造方法により得られたスフィンゴ脂質又はスフィンゴ脂質誘導体。

WO 98/03529

PCT/JP97/02483

図1

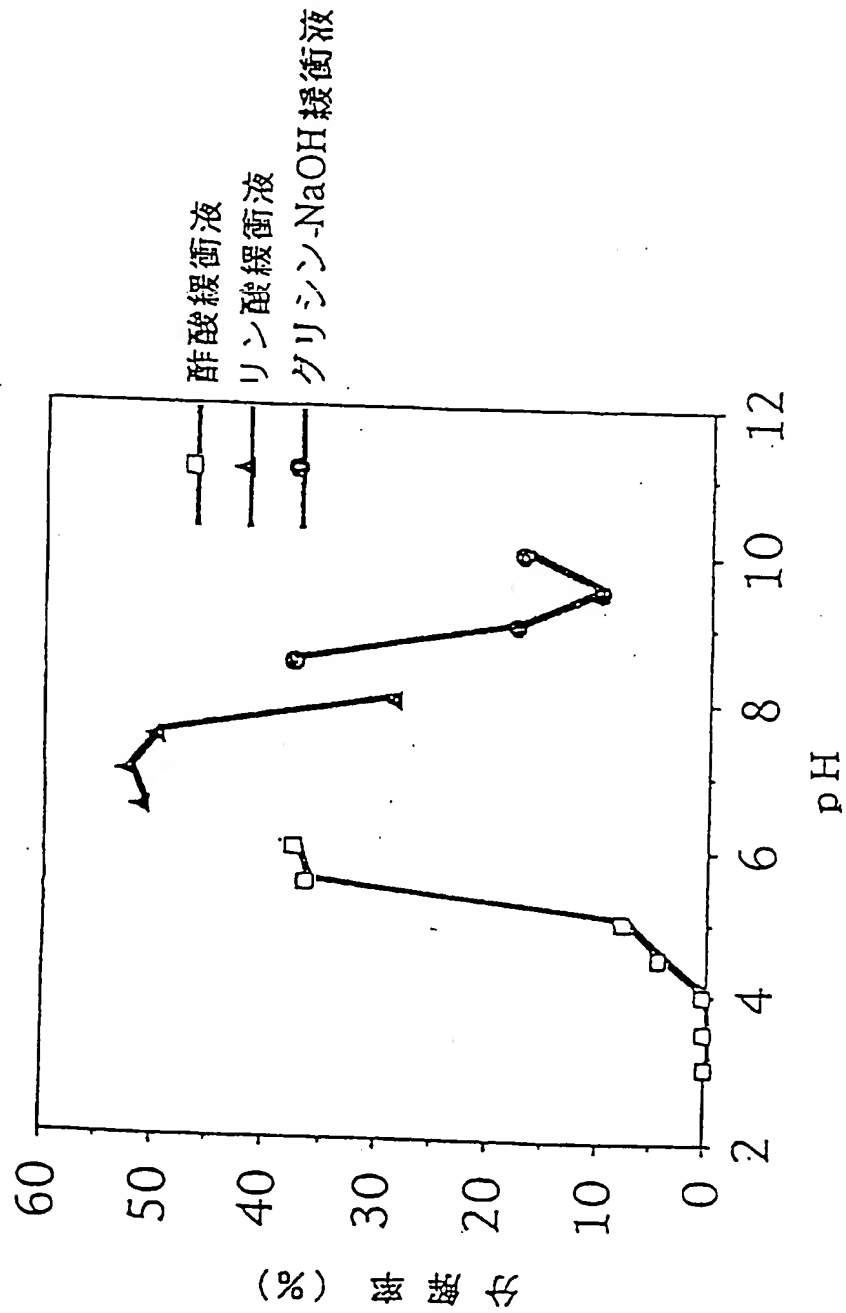




WO 98/03529

PCT/JP97/02483

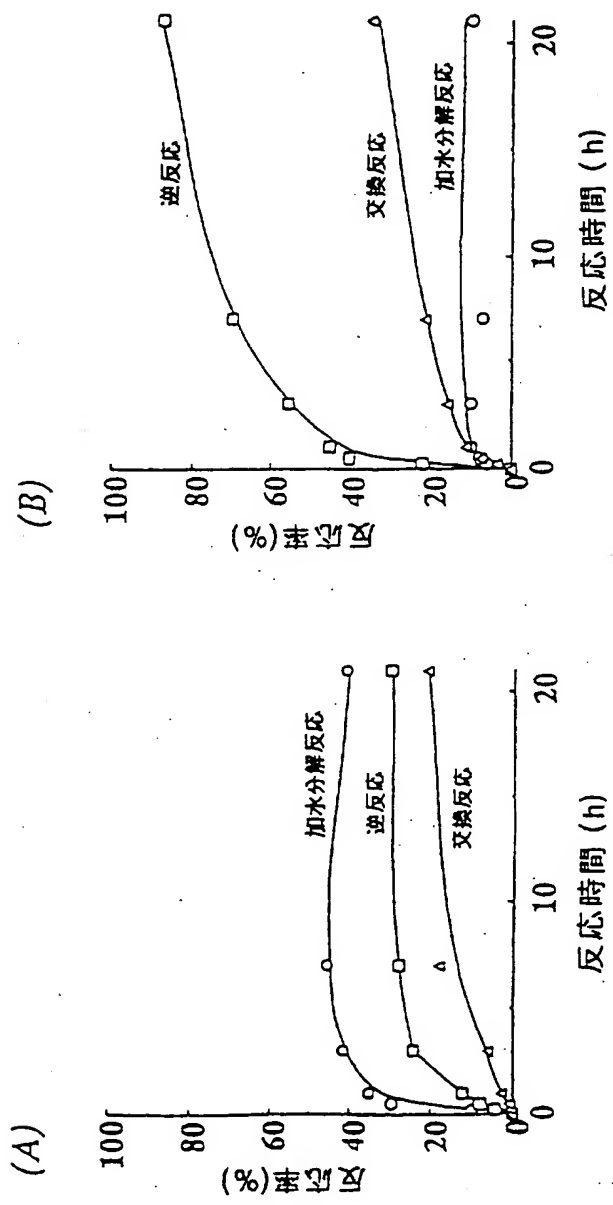
図2



WO 98/03529

PCT/JP97/02483

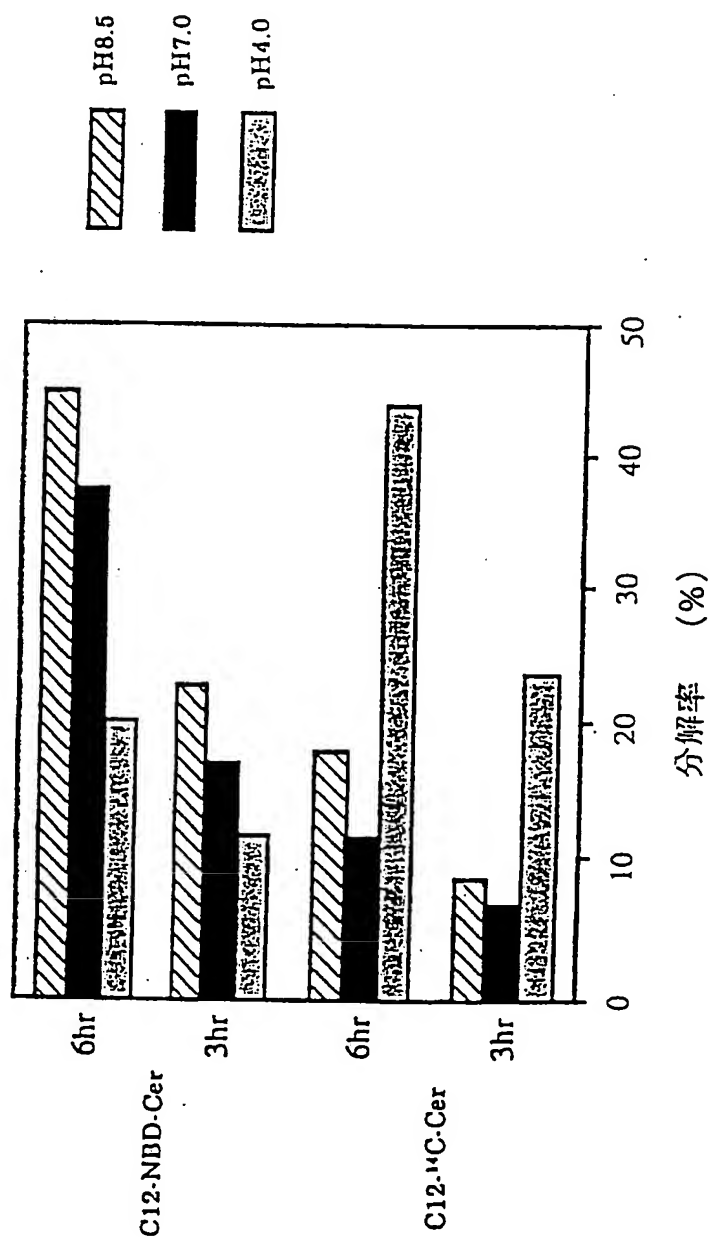
図3



WO 98/03529

PCT/JP97/02483

図4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02483

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07H15/04, C07F9/09, C12P13/02, C12P19/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07H15/04, C07F9/09, C12P13/02, C12P19/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-84587, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), April 2, 1996 (02. 04. 96) & EP, 707063, A	13
A		1 - 12
X	JP, 7-508889, A (Gist-Brocades N.V.), October 5, 1995 (05. 10. 95) & EP, 651817, A & US, 5610040, A	13
A		1 - 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 14, 1997 (14. 10. 97)

Date of mailing of the international search report

October 28, 1997 (28. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/02483

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C07H15/04, C07F9/09, C12P13/02, C12P19/44		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>8</sup> C07H15/04, C07F9/09, C12P13/02, C12P19/44		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), WPI/L		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-84587, A (寶酒造株式会社), 2.4月, 1996 (02.04.96) & EP, 707063, A	13
A		1-12
X	JP, 7-508889, A (ギスト プロカデス ナムローゼ フェンノートシャ ップ) 5.10月, 1995 (05.10.95) & EP, 651817, A & US, 5610040, A	13
A		1-12
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14.10.97		国際調査報告の発送日 28.10.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 谷口 博 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

